

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭59—204200

⑫ Int. Cl. ³ C 07 H 21/02 G 01 N 33/54 // C 12 Q 1/68 G 01 N 33/50	識別記号 厅内整理番号 7252—4C H 7906—2G 8213—4B Z 8305—2G	⑬ 公開 昭和59年(1984)11月19日 発明の数 2 審査請求 未請求
---	--	--

(全 9 頁)

⑭ 2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体およびその製造法

⑮ 特 願 昭58—75878

⑯ 出 願 昭58(1983)4月28日

⑰ 発明者 三好健一

広島県高田郡甲田町下甲立1624

湧永製薬株式会社中央研究所内

⑱ 発明者 鈴木正則

広島県高田郡甲田町下甲立1624
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑲ 発明者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624

湧永製薬株式会社中央研究所内

⑳ 出願人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目1番39

号

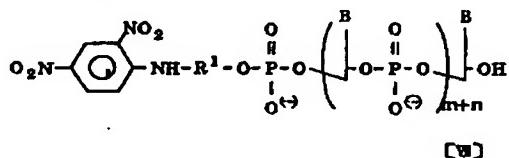
㉑ 代理 人 弁理士 猪股清 外3名

明細書

1. 発明の名称 2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式 [IV] で示される 2, 4-ジニトロフェニル-オリゴオキシリボスクレオチドであることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体。



[ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R¹ は 2 鍵の直鎖または分枝鎖の炭化水素残基であり、B はスクレオチドを構成する塩基である (B が複数個存在するとせ

は、それらは同一でも異なるてもよい。)]

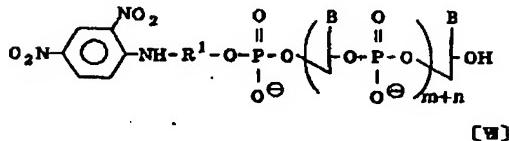
2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである。特許請求の範囲第 1 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体。

3. R¹ が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分枝鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載の 2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体。

5. 下式 [VI] で示されるオリゴスクリオチド誘導体の末端アミノ基に 2, 4-ジニトロベンゼンを結合させて下式 [V] で示される 2, 4-ジニトロフェニル-オリゴオキシリボスクレオチドを得ることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルスクリオチド誘導体の製造法。

1 - フルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンである、特許請求の範囲第6項記載の 2 , 4 - ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。



[ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、B¹は2箇の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはスクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい）。]

6. アミノ基と2 , 4 - ジニトロベンゼンとの結合を、アミノ基と1 - ハロゲノ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンとの脱ヘロゲン化水素反応によつて行なわせる、特許請求の範囲第5項記載の2 , 4 - ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。

7. 1 - ハロゲノ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンが

フェニル（以下DNPと略す）基を核酸に結合させた、DNAプローブが開発されている（Nucl. Acids Res., 10, 6787-6796 (1982)）。彼らは、アデノシントリリン酸(ATP)のDNP誘導体をDNA鎖に取り込ませ、相補的塩基配列を持つDNAにハイブリダイズさせたのち、DNPに対するウサギ抗血清およびペーオキシダーゼで標識したウサギ免疫グロブリンG型(IgG)に対するヒツジ抗血清を順次加えて目的DNAを検出している。ここで用いたDNA鎖は、天然から取り出したフラグメントである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして製造されるDNP - スクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

- (1) スクレオチドの塩基部分にDNPを含有するため、使用オリゴスクレオチド固有の融解温度(Tm値)に変化を生じる。
- (2) 任意でかつ定められた塩基配列をもつDNAの合成が困難である。

これらの理由によつて、現段階でのDNP - スク

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、2 , 4 - ジニトロフェニルスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、スクレオチドの塩基以外の部分に2 , 4 - ジニトロフェニルスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このような2 , 4 - ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法にも関する。

先行技術

放射性同位元素を使わず、特殊な抗体や酵素によつて検出することができる。ボリあるいはオリゴスクレオチド誘導体は、核酸用アフィニティープローブとして興味が持たれている。

近年、Vincentらによつて、2 , 4 - ジニトロ

スクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

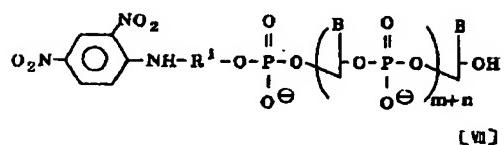
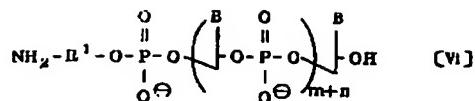
発明の概要

要旨

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボスクレオチドのスクレオチド塩基以外の特定部位に2 , 4 - ジニトロベンゼンを結合させてなるDNP - スクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明によるDNP - スクレオチド誘導体は下式[V]で示されるDNP - オリゴデオキシリボスクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるDNP - スクレオチド誘導体の製造法は、下式[VI]で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基に2 , 4 - ジニトロベンゼンを結合させて下式[VII]で示されるDNP - オリゴデオキシリボスクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



[ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R¹は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはスクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい）。]

効果

本発明者らの合成したDNP-オリゴデオキシリボスクレオチドは、前記核酸用非放射性アフィニティプローブの短所を回避することができて、下記のような長所をもつものである。

(1) スクレオチドの塩基部分にDNPを含有しないので、融解温度(Tm値)に変化を生じることが

なくて安定である。

- (2) いかなる塩基配列をもつDNP-オリゴスクレオチドも合成可能である。
- (3) プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。
- (4) 合成が非常に簡単であつて大量合成が可能であり、また長期保存も可能である。
- (5) プライマー（鏡型合成の際のDNA断片）としても利用できる。

最近、板倉らは、鎖長19の合成オリゴスクレオチドを用いてβ-グロビンの遺伝子病の診断を行なつておる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 80, 278 - 282 (1983)）、遺伝子中のわずか一つの塩基配列の違いも検出できる合成オリゴスクレオチドが各種遺伝子病解析に有用であることを示している。

彼らは合成オリゴスクレオチドの放射性同位元素(³²P)を使用したが、代わりに本発明者らが開発したDNP-スクレオチド誘導体を用いることができれば、非常に有用なことは明白であろう。

このような長所があるところから、本発明の

DNP-スクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。

すなわち、たとえば、DNP-オリゴスクレオチドは、非放射性核酸用アフィニティープローブとして、あるいはプライマーとして、利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法は抗体による沈降、酵素免疫活性測定、益光性染色体による可視化等々、多様であり、また本発明のDNP-スクレオチド誘導体は放射性プローブ(³²P)に比べて被曝の危険、コスト、廃棄物の処理および保存性の点でも有利である。

なお、DNP基は、市販のウサギ抗血清（たとえばMiles Laboratories, Code No. 61-006-1）または、DNPに対するモノクローナル抗体によつて容易に検出することができる。

発明の具体的説明

DNPスクレオチド誘導体 [IV]

本発明によるDNPスクレオチド誘導体は、前記の式[IV]で示されるものである。

式中、記号Bは、2'-デオキシリボスクレオ

シドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボスクレオシド残基を示すのに慣用されているものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基Bはスクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物[IV]中にBが複数個存在するときは、それらは同一でも異なるてもよい。

mおよびnは、それぞれ0または自然数を示す。本発明DNPオリゴスクレオチド誘導体の組合度がm+nで表示されているのは、本発明の好ましい製造法で組合度がそれぞれmおよびnのフラクションを結合させていることによるものである（詳細後記）。その場合のmは実用的には0～6、特に1～4、nは実用的には0～40、特に0～20、

である。

基 R¹ は、化合物 [II] の接頭部分と DNP 部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素基である。これは、特に炭素数 2 ~ 20 程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい R¹ は、炭素数 2 ~ 6 のアルキレン基である。

化合物 [III] の合成

一般的説明

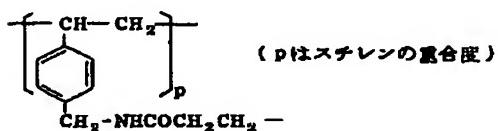
化合物 [IV]、すなわち本発明による DNP-ヌクレオチド誘導体、は合目的的な任意の方法によつて合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式 [VI] のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴヌクレオチドの 5'-末端リン酸基に基 R¹ を介して一級アミノ基が導入されたもの、のアミノ基に DNP を結合させることからなるものである。

一方、式 [VI] の化合物は、オリゴヌクレオチドの合成および生成オリゴヌクレオチドの 5'-水酸基延長上での一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

イルアデニン、N⁶-イソブチリルグアニン、N⁶-ベンゾイルシトシンおよびチミン（すなわち、保護不要）より選択される。

～～② スペーサーを介した担体であつて、通常は下記のものである。



化合物 [VI] の合成

一般にオリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれらの固相法および液相法がある。本発明者らは既に固相法によるオリゴヌクレオチド製造技術を確立しており、化合物 [VI] の合成には本発明者らの下記の方法が好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 8635 (1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473 (1980)

Nucleic Acids Research 8, 5491 (1980)

第 1 図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意味ないし詳細は、後記した通りである）。

R⁰ リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R¹ 二価の炭化水素基である。

R² 5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

R³ 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸ジエチルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

R⁴ アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

q n より小さい任意の自然数。

m 0 または任意の自然数。

n 0 および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常は N⁶-ベンゾ

Nucleic Acids Research 8, 5507 (1980)

Nucleic Acids Research Symposium Series

7, 281 (1980)

また、上記で合成したオリゴヌクレオチドの 5'-水酸基にリン酸基を介して一級アミノ基を導入する方法、すなわち化合物 [VI] の合成法としては、たとえば本発明者らの特願昭57-138136号明細書記載の方法がある。

化合物 [VI] の合成法をその一実施態様について示せば、下記の通りである。すなわち、第 1 図に示したように、化合物 [I] の保護基 R³ を除去したものと化合物 [II] の保護基 R² を除去したものを結合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物 [VI] を合成する。オリゴヌクレオチド化合物 [III] の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法（特願昭57-138136号明細書参照）に従つて、式 [IV] の化合物を合成する。すなわち、化合物 [I] の R³ を除去して 5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤（たとえば、ホスホジトリアグリド、ホスホジタリドま

たはホスホジベンゾトリアゾリド等)を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物 R^2-NH-R^1-OH [この化合物はオメガ-アミノアルコール (NH_2-R^1-OH) のアミノ基を R^2 で保護することにより得ることができる]を縮合させることにより、化合物 [IV]を得ることができる(詳細は該明細書参照)。

この化合物 [IV] の保護基 R^2 を除去し、化合物 [III] の保護基 R^2 を除去したものと縮合させて、化合物 [V] を合成する。縮合は、化合物 [IV] の合成の際の縮合と本質的には変わらない方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物 [V] の保護基をすべて除去すれば、化合物 [VI] が得られる。保護基 CO $\sim\sim$ ①、リン酸トリエステル中のオルト-クロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、0.5M のテトラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水 (9:1, (V/V)) 混液で処理後、アルカリ処理(淡アンモニア水)を行なうことより除去される。 R^4 が

させることによつて得ることができる。

両者の結合は、2,4-ジニトロベンゼンの1-位と化合物 [VI] のアミノ基との間のC-N結合の形成を実現することのできる任意の方法によつて行なうことができる。

両者の結合は、一般に、前者の誘導体、すなわちDNP-X (Xは1-置換基)とアミノ基との間の脱H-X結合によることがふつうである。Xとしては、ハロゲンが好ましい。Xがハロゲンである誘導体、すなわち1-ハログノ-2,4-ジニトロベンゼンが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないで5'-水酸基末端延長上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。とりわけ、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンは市販され容易に入手でき、粗かな反応条件で化合物 [VI] のアミノ基との反応が進行する。

1-ハログノ-2,4-ジニトロベンゼンと化合物 [VI] との反応は、両者の均一溶液中(溶媒は、たとえば含水アルコール)あるいは不均一溶液中

トリフルオロアセチル基の場合は、アンモニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルfonyl基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。 R^4 として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに縮合その他について上記以外の詳細は核酸の化学合成に関する成書や総説たとえば「ヌクレオシド・ヌクレオチドの合成」(丸善 1977年)、「核酸有機化学」(化学同人 1979年)、「核酸」(朝倉書店 1979年)、Tetrahedron, 34, 3143(1978)、有合化, 34, 723(1978) および化学の領域, 33, 566(1978) 等を参照することができる。

化合物 [W] の合成

DNP-オリゴデオキシリボヌクレオチド(化合物 [W])は、上記化合物 [VI] の5'-末端延長上の一級アミノ基に2,4-ジニトロベンゼンを結合

(溶媒は、たとえば水)、ハロゲン化水素捕捉剤(たとえば、炭酸水素ナトリウム、トリエチルアミン、水酸化カリウム等)の存在下に、10~50°C程度の温度で実施することができる。目的生成物は、たとえば抽出によつて回収すればよい。なおDNP化に関しては、適当な総説、たとえば「実験化学講座1、蛋白質の化学II、第118頁」(1976年(丸善(株)発行)等を参照することができる。

実験例

1) フローチャート

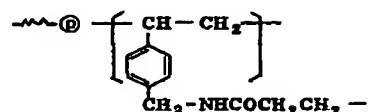
第2図のフローチャートに従つて、本発明化合物(同図の化合物①)を製造した。

第2図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMTr ジメトキシトリル



R⁰ オルトクロロフェニル

Et エチル

CE - シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

2) 化合物[VI] (第2図の①) の合成

実験 1 - 1

ジメトキシトリルアデノシン/樹脂[①]

(樹脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 300 mg (0.033 mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15:85, V/V) 溶液 10 ml で 3 回洗浄後、臭化鉱鉛の 1.0 M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8 ml で 5 分間ずつ 4 回反応 (脱トリル化) させて樹脂 [②] を得る。樹脂 [②] をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10 ml で 3 回洗浄し、これにジスクレオチド [③] 150 mg (0.1 mmol) のビリジ

ン溶液を添加後、共沸させて系を無水とし、メチレンスルホニルニトロトリアゾリド (以下 MSNT と記す) 150 mg (0.5 mmol) と無水ビリジン 2 ml とを添加して 90 分間反応 (結合) させる。反応後、ビリジン 10 ml で 3 回洗浄し、残渣量 (約 10 mg) のジメチルアミノビリジン (以下 DMAP) を含む無水酢酸-ビリジン (1:9, V/V) 溶液 10 ml を添加し 10 分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをビリジンで洗浄して、化合物 [④'] (n = 2) を得る。以上のような操作を 6 回くり返して、化合物 [④] (n = 12) を得る。

一方、5'-ヒドロキシジスクレオチド [⑤] 800 mg (0.71 mmol) とオルトクロロフェニルホスホジトリアゾリドとを後者のジオキサン溶液 (1.0 mmol, 6 ml) 中で 2 時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300 mg (1.4 mmol) および 1-メチル-イミダゾール 115 mg (1.4 mmol) を加えてさらに 2 時間反応させる。反応終了後、溶媒を留去し、残渣

をクロロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および 5 % の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製 (溶出液として 0 ~ 4 % のメタノール含有クロロホルムを使用) し、溶出液を濃縮後ベンタイン中に滴下し粉末状の化合物 [⑥] を得る。

上記で合成した化合物 [④] (n=12) 115 mg, (3.45 μmol) を前述と同様の方法で脱トリル化したもの [⑦] に、化合物 [⑥] 60 mg (0.04 mmol) をトリエチルアミン-ビリジン-水 (1:3:1, V/V) 溶液 3 ml で処理 (脱シアノエチル化) した化合物 [⑧] を加え、無水にしたのち、MSNT 50 mg (0.2 mmol) およびビリジン 1 ml を加え 90 分間反応 (結合) させ、反応終了後ビリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴスクレオチド誘導体 [⑨] を得る。

オリゴスクレオチド誘導体 [⑨] 15 mg を 0.5 M

テトラメチルグアニジン-ビリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水 (9:1, V/V) 溶液 200 μl を加え、透沈管中、室温で 24 時間反応させる。反応後、50 ℃で一夜反応させる。反応終了後、沪過し、沪液を濃縮後、水に溶解させてからエーテルで抽出を行なう。水層を濃縮後、セファデックス G-50 (φ1.5 × 120 cm, 溶出液は 0.05 M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で脱塩精製しペンタデカアデニル酸誘導体 [⑩] を得た。

また同様の方法で実験 1 - 2, 1 - 3 および 1 - 4 のようなオリゴスクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第 1 表に示す。

第1表

実験 番号 例	化合物①の内容	
	m+n	(B) _{m+n} B
1-1	14	AAAAAAAAAAAAAA
1-2	14	TTTTTTTTTTTT
1-3	14	GGATGCATCACCC
1-4	16	AATCTGGTGAGAACCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフイーの結果を第3図に示す。A～Dは、それぞれ実験1-1～1-4の化合物についての図である。

3) 2, 4-ジニトロフェニル-ペントダカアデニル酸[①]の製造

実験2-1

上記実験1-1で合成したペントダカアデニル酸導体[①]約1.0ODを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 8.3)10mlに溶解し、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンのエタノール溶

液(50mg/ml)5ml(大過剰)を加えて37℃で2時間反応させた後、水30mlを加えエーテル150mlで4回抽出を行ない、2, 4-ジニトロフェニル-ペントダカアデニル酸[①]を得る。反応の確認は、高速液体クロマトグラフィーにより行なつた。

またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴスクレオチド[②]を脱保護して得た5'-水酸基をもつ化合物[③]も同様に1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンと反応させる。

上記実験1-2、1-3および1-4で合成した化合物[①]についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物[④]を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物[③]をも製造し、化合物[③]と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2、2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。

実験 番号 例	化合物①の内容		(B) _{m+n} B	m+n		
	m+n	(B) _{m+n} B				
2-1	14	AAAAAAAAAAAAAA	14	14		
2-2	14	TTTTTTTTTTTT	14	14		
2-3	12	ATGGCATCACCC	12	12		
2-4	14	TCTGGTGAAAGGCC	14	14		

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4図(高速液体クロマトグラフイーの結果)に示す。

第4図は高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示すものである。図中、1は何れも反応前の化合物そのもの、2は何れも化合物と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを反応させたもののクロマトグラムである。イは実験2-1で式[④]である化合物、ロは実験1-1で式[④]である化合物、ハは実験2-2で式[④]である化合物、ニは実験1-2で式[④]である化合物、ホは実験2-3で式[④]である化合物、ヘは実験1-3で式[④]である化合物、トは実験2-4で式[④]である化合物、チは実験1-4で式[④]である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

これらの結果からみれば、式④で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図のイ-1、ハ-1、

ホ-1、およびト-1)は1-フルオロ-2、4-ジニトロベンゼンと反応していないことがわかる(第4図イ-2、ハ-2、ホ-2、およびト-2)。

それに対してもオリゴヌクレオチド誘導体[①]は1-フルオロ-2、4-ジニトロベンゼンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンに変化が生じて、原料のピーク(第4図ロ-1、ニ-1、ヘ-1およびチ-1)はなくなつておらず、1-フルオロ-2、4-ジニトロベンゼンと反応して新しい化合物(第4図ロ-2、ニ-2、ヘ-2およびチ-2)ができることがある。

すなわち、一级アミノ基を有する化合物[①]は1-フルオロ-2、4-ジニトロベンゼンと選択的に反応し、5'-水酸基をもつ化合物[②]とは全く反応しないことがわかる。

なお、第4図の保持時間5分程度で各々溶出されるピークは、2、4-ジニトロフェノールと考えられる。

上記において、高速液体クロマトグラフィーは日本分光HPLC System Tri-Rotor IIIを用い、次の条件により測定を行なつた。

カラム : μ -Bondapak C18 (Waters)

流速 : 2 ml/分

溶出液 : アセトニトリルを含む、20 mM-TAA緩衝液(pH 7.2)。

濃度勾配: アセトニトリルの濃度6~14% / 16分(16分以後は14%を続ける)。

4. 図面の簡単な説明

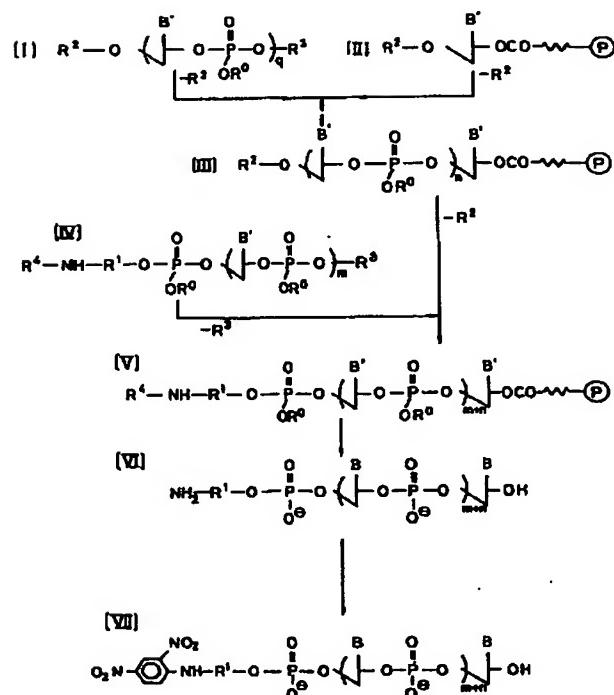
第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第2図は、実験例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

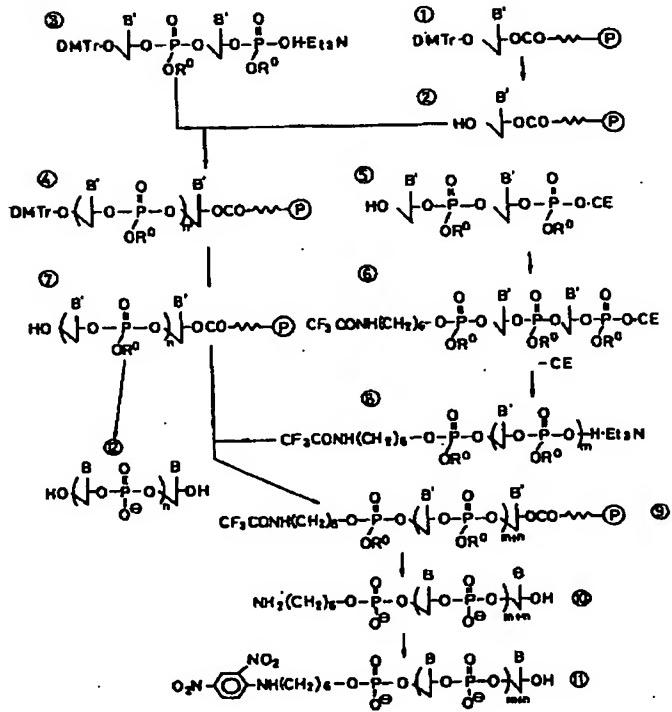
第3図A~Dは、実験例で示した化合物[VI]の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

第4図は、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

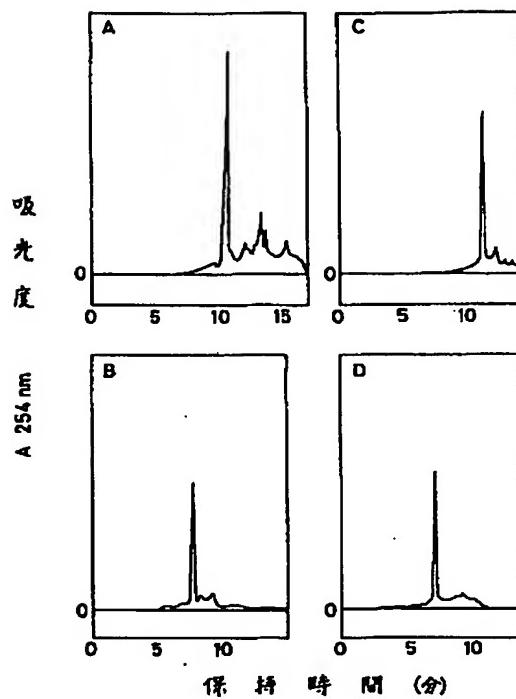
第1図



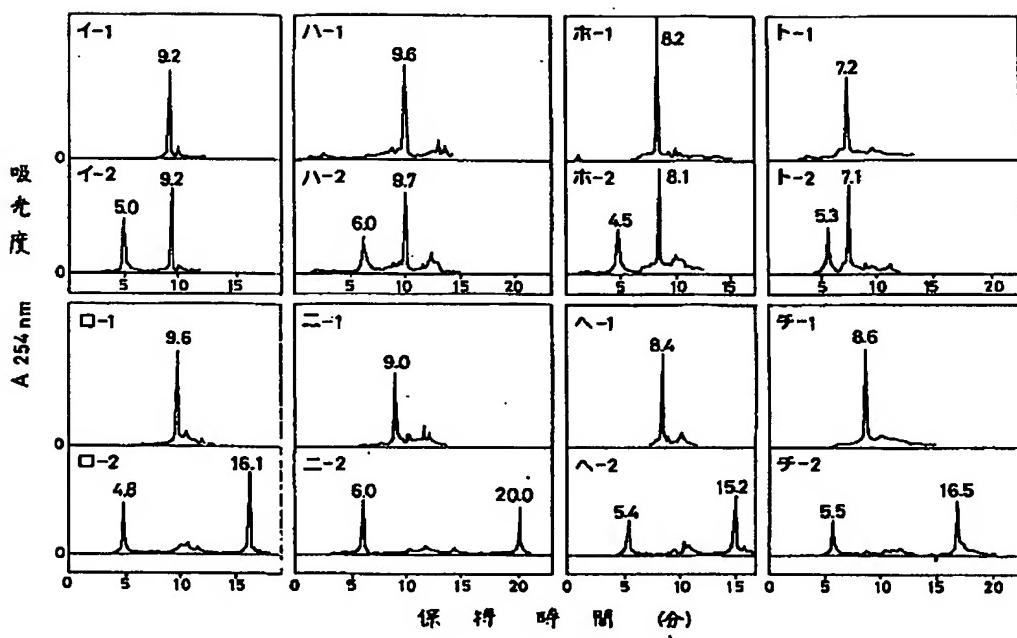
第2図



第3図



第4図



平成 2.2.-6 発行

手 球 据 正 書

平成 1 年 8 月 2 日

特許庁長官 古田文毅

1 事件の表示

昭和 58 年特許願第 75878 号

2 発明の名称

2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体

3 据正をする者

事件との関係 特許出願人
清水製薬株式会社

4 代理人 (郵便番号 100)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
〔電話東京 (211)2321 大代表〕

6428弁理士佐藤一

5 据正命令の日付

発送日 平成 年 月 日

6 据正により減少する発明の数 1

7 据正の対象

明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」、及び「発明の詳細な説明」の各項

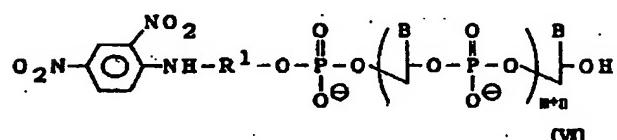
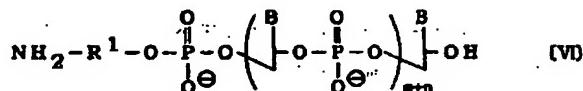
特許方
1821

8. 据正の内容

- (1) 発明の名称「2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体およびその製造法」を「2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体」に据正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙の通り据正する。
- (3) 明細書第4頁12~13行の「本発明は、……にも関する。」を削除する。
- (4) 図書第6頁15行から第7頁1行の「また、……(VI)」を削除する。
- (5) 「オリゴヌクレオチドの放射性」を「オリゴヌクレオチドの検出に放射性」に据正する。
- (6) 図書第8頁最終行~第9頁2行の「このようない……考られる。」を削除する。
- (7) 図書第9頁7~8行の「蛍光性染色体による」を「蛍光性染色による」に据正する。
- (8) 図書第9頁15行~16行の間に「このようない長所があるところから、本発明のDNP-ヌクレオチド誘導体の利用方法の拡大も考られる。」を改行して挿入する。

(9) 図書第11頁12行の「一つの好ましい方法は、」と「前記の式(VI)」の間に下記の内容を挿入する。

「下式(VI)で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の末端アミノ基に2, 4-ジニトロベジゼンを結合させて下式(VII)で示されるDNP-オリゴヌクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



【ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R¹は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である(Bが複数個存在するときは、それ

平成 2.2.-6 発行

らは同一でも異なってもよい。」)

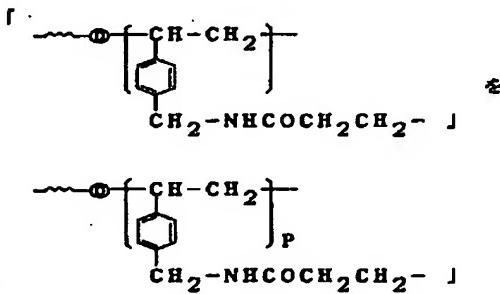
すなわち、この方法は、」

(10) 国書第16頁7行の「デオキシオリゴリボヌクレオチド」を「オリゴデオキシリボヌクレオチド」に補正する。

(11) 国書第17頁13行の「5'-水酸基末端」を「5'-末端」に補正する。

(12) 国書第18頁8行の「(1976年(丸善)(株)発行)」を「(1976年、丸善(株)発行)」に補正する。

(13) 国書第18頁最終行の



「第2表

調 実 験 題 例	化合物②の内容		調 実 験 題 例	化合物①の内容	
	n	(B) _n B		n+a	(B) _{n+a} B
3-1	12	AAAAAAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAAAAAAA
3-2	12	TTTTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTTTT
3-3	12	ATCCATCACCAACC	2-3	14	GGATCCATCACCAACC
3-4	14	TCTCGTCAGAACCCG	2-4	16	AATCTCGTGACAAACCCG

(22) 国書第26頁9~10行の「実験2-1」

を「実験3-1」に補正する。

(23) 国書第26頁10行の「実験1-1」を
「実験2-1」に補正する。

(24) 国書第26頁11行の「実験2-2」を
「実験3-2」に補正する。

(25) 国書第26頁12行の「実験1-2」を
「実験2-2」に補正する。

(26) 国書第26頁13行の「実験2-3」を
「実験3-3」に補正する。

(27) 国書第26頁14行の「実験1-3」を

に補正する。

(14) 国書第19頁5行の「n' 2」を削除する。

(15) 国書第22頁2行の「アルドキシメイト」
を「アルドキシム」に補正する。

(16) 国書第24頁3行の「4回抽出」を「4回
試験の除去」に補正する。

(17) 国書第24頁10行の「と反応させる。」
を「と反応させる(対照実験3-1)。」に補正
する。

(18) 国書第24頁13行の「を製造する。」を
「を製造する。この実験をそれぞれ2-2、2-
3、2-4とする。」に補正する。

(19) 国書第24頁下から3~2行の「実験2-
2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-
3および3-4」に補正する。

(20) 国書第24頁最終行の「化合物を」を「化
合物および対照実験3を」に補正する。

(21) 国書第25頁の第2表を次の通り補正する。

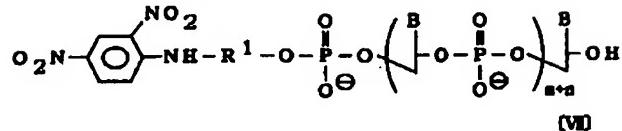
「実験2-3」に補正する。

(22) 国書第26頁14~16行の「実験2-4
…実験1-4」を「実験3-4で式②である
化合物、テは実験2-4」に補正する。

平成 2. 2. - 6 発行

特許請求の範囲

1. 下式 [VI] で示される 2, 4 - ジニトロフェニル - オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、2, 4 - ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。



(ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R¹ は 2 個の直鎖または分岐鎖の炭化水素基であり、B はヌクレオチドを構成する塩基である (B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。)

2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第 1 項記載の 2, 4 - ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

3. R¹ が炭素数 2 ~ 20 の直鎖または分岐

鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の 2, 4 - ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載の 2, 4 - ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.